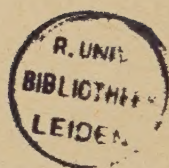


Aus dem Pathologischen Institut der Universität
Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. Erich Müller

Das elektrophistologische Verhalten der normalen und der arterio- sklerotisch veränderten Aortenintima

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt von
Volker v. Loewenich
aus Erlangen



Dekan: Professor Dr. Eugen Schreck

Referent: Professor Dr. Erich Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 1. 3. 1961.

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. ERICH MÜLLER)

Das elektrohistologische Verhalten der normalen und der arteriosklerotisch veränderten Aortenintima

Von

E. MÜLLER und V. v. LOEWENICH*

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. März 1961)

Die im deutschen Schrifttum heute vorwiegend vertretene Anschauung über die Entstehung der Arteriosklerose betrachtet eine ödematöse Auflockerung der Arterienintima als erste Veränderung im Sinne der beginnenden Sklerosekrankheit. Dieser z. T. als ödematöse Blutplasmainfiltration gedeutete Vorgang wird teils als Folge einer mechanischen (RIBBERT), teils einer chemisch-toxischen Alteration (BREDT, HOLLE, W. W. MEYER) oder aber im Sinne einer hypoxisch bedingten Dyshorie angesehen (H. MEESSEN, W. ROTTER). Gleichgültig welcher Ansicht man den Vorzug gibt, wird dem Eindringen von Blutplasma und damit von Eiweiß in die Intima in der Frühphase der Gefäßsklerose besondere Bedeutung zugemessen: mit ihr wird die ödematöse Verdickung der Intima mit Faserauflockerung und regressiven Zellveränderungen, aber auch die Hyalinose erklärt (E. MÜLLER). Auf rezidivierende Eiweißinsudation folgt nach dieser Ansicht eine bindegewebige Organisation, die ihrerseits zu hyalinfaseriger Sklerose führen kann. Weitere Durchtränkungen verursachen vornehmlich in den lichtungsnahen Abschnitten eine Faserverdickung, während die medianahen Bezirke zunehmend das Bild der atheromatösen Nekrose zeigen, bedingt durch die schlechtere Sauerstoffversorgung dieser Bereiche (HOLLE, E. MÜLLER, ROTTER) oder durch Stauung des Insudates an der Mediagrenze (W. W. MEYER, ROTTER, SINAPIUS). Nach MEYER ist eine Verdickung vorhandener und ein Aufbau neuer Fasern nicht ohne vorherige Eiweißinsudation, d. h. Materialanfuhr denkbar. Aber auch in den Bezirken von Quellung oder Nekrose kann das Vorhandensein strukturfremden Eiweißes angenommen werden (E. MÜLLER). Das Eiweißmosaik der Intima wird also vermutlich bei allen Veränderungen im Sinne einer Arteriosklerose mit verändert. Es bot sich an, durch Untersuchung des elektrohistologischen Verhaltens normaler und verschiedengradig veränderter Intimastrukturen nach Unterschieden zu suchen, die eventuelle Rückschlüsse auf die jeweilige Anreicherung arteriosklerotischer

Herde verschiedener Entwicklungsstufen mit plasmogenen Eiweißen erlauben könnten. In diesem Zusammenhang sei eine Angabe LETTERERs vermerkt, nach welcher Amyloideiweiß einen Umladungsbereich im sauren Gebiet bei p_H 3,8—4,6 zeigt. Weitere Untersuchungen hinsichtlich der elektrostatischen Gesamtladung pathologisch-histologischer Substrate oder abnormer Eiweißablagerungen sind uns nicht bekannt geworden.

Die im histologischen Präparat zur Darstellung kommenden Strukturen bestehen großenteils aus Proteinen bzw. Proteiden, die zumeist amphoteren Charakter tragen, d. h. ihre elektrische Ladung je nach der Wasserstoffionenkonzentration der Umgebung ändern entsprechend dem Überwiegen ihrer dissoziierten sauren oder basischen Gruppen. Färbt man nacheinander oder an Parallelschnitten mit nicht-umladbaren sauren und basischen Farbstoffen bei verschiedenem p_H , so erhält man mit dem basischen Farbstoff ansteigend im alkalischen Bereich — in dem das Eiweiß wie eine Säure reagiert — eine kräftige, in saurem Milieu dagegen eine sich abschwächende oder schwindende Anfärbung des hier wie eine Base reagierenden Eiweißes; umgekehrt liegen die Verhältnisse bei Verwendung eines sauren Farbstoffes (PISCHINGER). Aus der kurvenmäßigen Darstellung der Färbeergebnisse läßt sich der isoelektrische Punkt ablesen. Da nun die histologischen Strukturen nicht ein einheitliches Proteinsubstrat darstellen, sondern aus einem nicht ohne weiteres zu definierenden Proteingemisch bestehen, ist nur ein mittlerer isoelektrischer Punkt meßbar (IEPm, SCHÜMMELFEDER). Auch ein solcher kann durchaus mit einer Änderung des Eiweißmosaiks verschoben werden; nicht verändert erscheint die elektrostatische Ladung natürlich dann, wenn die Gesamtladungsverhältnisse sonst verschiedener Eiweißgemische nicht differieren.

Bei der eingangs hervorgehobenen Bedeutung einer ödemartigen *Eiweißinsudation* in der Frühphase arteriosklerotischer Gefäßwandschäden und der Bedeutung einer *Hyalinbildung* für die Pathogenese der Arteriosklerose und für die morphogenetisch in verschiedener Richtung sich entwickelnden Erscheinungsformen der Gefäßsklerose wurden mit der Methode der Pufferfärbung nach PISCHINGER arteriosklerotische Gefäßwandherde verschiedenster makroskopischer und histologischer Art untersucht.

Färberisches Vorgehen

Da eine wesentliche Vorbedingung für verwertbare Ergebnisse ein exaktes Einhalten aller Färbungsschritte ist, wird im folgenden auf das Methodische ausführlicher eingegangen. Bei der Obduktion entnommene Aortenteile wurden in Stücken von 5—10 mm Kantenlänge 48 Std in 10% igem sauren Formalin fixiert, anschließend 24 Std in fließendem Wasser ausgewaschen und schonend über die übliche Paraffinreihe eingebettet. Die Schnittdicke wurde mit $7,5 \mu$ gewählt, zu dick oder zu dünn geratene Schnitte wurden regelmäßig verworfen. Die Schnitte wurden mit sehr wenig Eiweißglycerin aus destilliertem Wasser bei $62^\circ C$ aufgeklebt, entgegen den Angaben PISCHINGERs und anderer Autoren, die nie Eiweißglycerin verwenden. Die praktisch nicht sichtbare Mitanfärbung des Eiweißglycerins ist unseres Erachtens leichter in Kauf zu nehmen als die Gefahr, daß die nur mit Aqua dest. aufgezogenen, bei der Paraffinmethode gewöhnlich schlecht zu glättenden Aortenschnitte bei der Weiterverarbeitung abschwimmen.

Die Färbung nach PISCHINGER erfolgte in der von HAUG angegebenen Modifikation: Nach Entparaffinierung wurden die Präparate für 2 min in eine einmal gewechselte Pufferlösung gestellt. Anschließend kamen die Schnitte für 10 min in gepufferte Methylenblau- bzw. Kristallponceaulösung, danach zur Spülung 60 sec in nach Farbstoffen getrennte Pufferlösung. Die in Kristallponceau gefärbten Präparate wurden dann kurz zwischen zwei Lagen Filtrierpapier getrocknet, entwässert und in Eukitt eingeschlossen. Die mit Methylenblau behandelten Schnitte wurden nach der Spülung für 5 min in 5% iger Ammoniummolybdatlösung fixiert, 2 min in Aqua dest. gespült und nach Entwässerung gleichermaßen eingedeckt (Einzelheiten s. bei HAUG). Alle Zeitmaße wurden mit der Stoppuhr bestimmt.

Um das Altern der Lösungen während der einzelnen Färbeserie auszugleichen, wurden die Schnitte immer in gleicher Reihenfolge an einem Tag in den frisch angesetzten Lösungen gefärbt. Am nächsten Tag durchliefen neue Schnitte in genau umgekehrter Reihenfolge die gleichen Lösungen.

Die Färbeserien wurden auf folgende p_H -Werte eingestellt: 2,6; 3,2; 3,7; 4,3; 4,9; 5,3; 6,0; 6,6; 7,25; 7,6; 8,3. Die Wasserstoffionenkonzentration wurde jeweils mit der Glaselektrode gemessen (Einstabmeßkette Typ 406 der Firma Ingold mit „WTW“ p_H -Meter, Anzeigegenauigkeit nach Werksangabe $\pm 0,1 p_H$). Als Puffer fand ausschließlich das isotone Acetat-Veronalgemisch nach MICHAELIS Verwendung.

Auswertung

Die angefärbten Strukturen wurden nach dem Vorschlag von LEVINE mit Farbtafeln verglichen: Auf Zeichenpapier wurden gleich große Quadrate mit einer fortlaufenden Verdünnungsreihe der m/250 Farbstofflösungen gleichmäßig ausgemalt. Da die auf diese Weise mit Methylenblau hergestellte Karte gegenüber den Präparaten zu grün ausgefallen war, wurde ein anderer

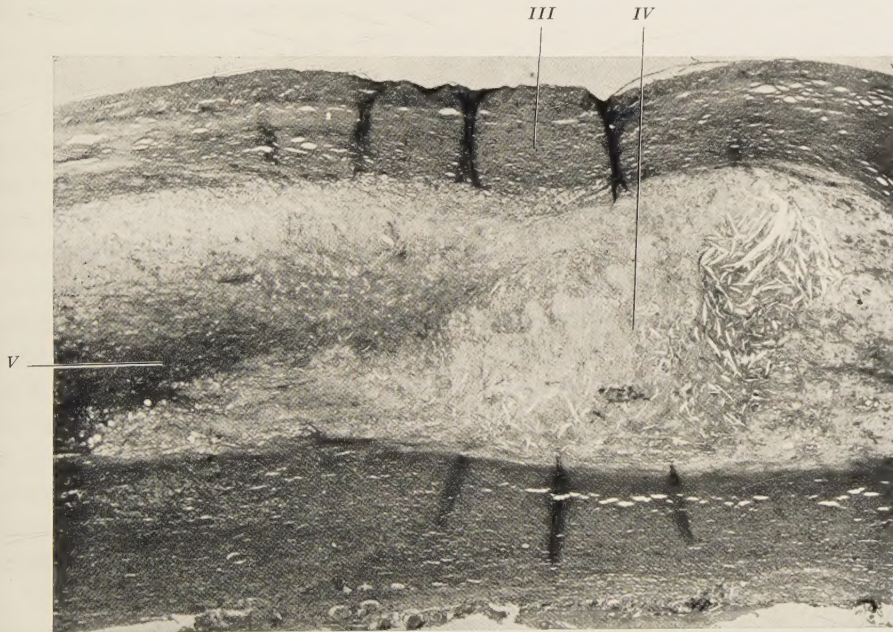


Abb. 1. Beispiel verschiedener histologischer Gruppen in einem Schnitt: Lichtungsnahe hyaline Faserverdichtung (III), atheromatöse Quellungsnekrose (IV) und hyalin-fibrinoide Zone (V) (Färbung: gepufferte Methylenblaulösung). Ergebnisse in Tab. 1

Karton erst mit einer entsprechenden Verdünnungsreihe einer May-Grünwald-Lösung und nach Antrocknung derselben mit der halben Menge der Methylenblauverdünnung ausgemalt. Die im Gebrauch umständlichere Benutzung eines Colorimeters mit Vergleichsocular bietet nach unseren Erfahrungen keine Vorteile. Die Farbdichtestufen der beschriebenen Tafeln wurden als dimensionslose Werte mit Ziffern bezeichnet und diese auf die Ordinate eines Koordinatensystems linear

aufgetragen. Um durch wechselnde Strukturdichte und vielleicht auch Schnittdicke mögliche Fehler zu vermeiden, wurden immer gleiche, vorher auf einem Photogramm festgelegte Stellen eines Präparates ausgewertet (s. Abb. 1). Der jeweils aus mehreren Schnitten gewonnene Mittelwert wurde in ein Diagramm eingetragen. Dieses enthielt, da wie oben erwähnt in jedem Farbstoffansatz an zwei aufeinander folgenden Tagen je ein Präparat gefärbt worden war, somit pro Farbstoff und p_H -Stufe je zwei Markierungspunkte. Außer den Schnittpunkten der so erhaltenen gegenläufigen Kurven wurden die Orte der positiven und negativen Krümmungsmaxima bestimmt und aus diesen der in der Mitte zwischen beiden Maxima liegende p_H -Wert, der „mittlere Umladungsbereich“ der einzelnen Kurven gewonnen.

Hierbei zeigte sich, daß der Mittelwert aus den mittleren Umladungsbereichen eines Kurvenpaares jeweils recht genau dem Schnittpunkt dieser Kurven entsprach, ein Zeichen dafür, daß die Farbtafeln, obwohl nicht genau gleich hergestellt, einander adäquat waren.

Beurteilung der Methode

Durch Untersuchungen von LAVES ist bekannt, daß der isoelektrische Punkt histologischer Strukturen durch Autolyse in alkalischer Richtung verschoben wird. Bei Verwendung von Obduktionsmaterial läßt es sich nun nicht umgehen, Organstücke verschieden lange Zeit nach dem Tod zu fixieren. Allerdings war zu vermuten, daß eine Autolyse bei der Bradytrophie der Aortenwand kaum so rasch einsetzen würde wie in dem von LAVES untersuchten Leberparenchym. Wir haben diese für die Gefäßwand überprüft und keine Unterschiede bei fortschreitender postmortaler Zeit gefunden (vgl. Tab. 1).

Es ist ferner bekannt, daß Formalin den isoelektrischen Punkt des Gewebes gegenüber dem von PISCHINGER als indifferent bevorzugten Alkohol um 1–1,5 p_H -Stufen nach der sauren Seite verschiebt (ZEIGER). Doch auch Alkohol läßt den IEP keineswegs unangetastet, sondern verschiebt ihn, wie YASUZUMI an Blutzellen nachwies, gegenüber dem kataphoretisch in gleichen Pufferlösungen ermittelten IEP in alkalischer Richtung. Sogar die als besonders schonend betrachtete Gefriertrocknung verlagert ihn deutlich in die Richtung niedrigeren p_H 's (v. MAYERSBACH und SCHUBERT). Diese Verlagerung des IEP durch Fixierungsmittel ist überdies bei unterschiedlichen Färbemethoden verschieden: So rücken Alkohol und Formalin den IEP bei Färbung mit dem Fluorochrom Acridinorange gleichermaßen zu stark sauren Werten (SCHÜMMELFEDER und STOCK). Da es sich also offensichtlich um eine reine Vergleichsmethode handelt, kann in einem konsequenten Verfahren ein beliebiges Fixationsmittel gewählt werden. Wegen seiner bequemen Handhabung, seiner weitgehend bekannten Wirkungsweise und der im Vergleich zu Alkohol weit besseren Erhaltung der vitalen Struktur bevorzugten wir das Formalin.

Auch die verwendeten Puffergemische bleiben nicht ohne Einfluß auf die Lage des IEP, sowohl bei kataphoretischer Bestimmung (FRICKE und LEONHARDT) als auch bei Pufferfärbungen, wie SCHÜMMELFEDER anhand seiner Acridinorange-Methode zeigte. Dabei verschiebt der von uns wegen seines großen Einstellungsbereiches angewandte isotone Veronal-Acetat-Puffer nach MICHAELIS den IEP vergleichsweise stark zur sauren Seite. Es darf also grundsätzlich bei solchen Untersuchungen nur *ein* Puffergemisch verwendet werden.

Wie aus den angeführten Tatsachen hervorgeht, ist die Pufferfärbung gleich welchen Verfahrens immer nur eine reine Äquivalentmethode, die aber bei sorgfältig eingehaltener gleicher Technik durchaus Vergleiche erlaubt.

Ergebnisse

Die Ausmessung der mit Kristallponceau gefärbten Schnittpräparate bot keine Schwierigkeiten. Der jeweilige Farbton von Farbtafel und Schnitt ließ sich leicht vergleichen. Die Verbindung der nur wenig streuenden Meßpunkte ergab durchwegs regelmäßige S-förmige Kurven. Die Auswertung der mit Methylenblau behandelten Präparate ward dagegen durch eine wechselnd starke Metachromasie erschwert, welche auf einen wechselnden Mucopolysaccharidgehalt zurückzuführen ist; Farbkarte und Schnitt differierten oft in der Tönung mehr oder weniger stark. Die Beurteilung der Farbdichte wird dabei nicht wesentlich beeinträchtigt. Die Kurven verliefen steiler als die der Ponceaureihe, ihr mittlerer Umladungsbereich fand sich im allgemeinen um 0,4 bis 0,7 p_H -Stufen weiter im Sauren. Ein im stark sauren Bereich flach auslaufendes Kurvenende fehlte mehrfach. Der Schnittpunkt beider Kurven lag gewöhnlich in der Mitte zwischen den mittleren Umladungsbereichen beider Kurven (s. Abb. 2).

Wie aus der Tab. 1 zu sehen ist, zeigen die Strukturen verschiedengradig veränderter Bereiche der Aortenintima („histol. Gruppen“) in ihrem elektrophysiologischen Verhalten keine Unterschiede, die die Fehlerbreite der Methode überschreiten. Vor allem die mit der Ponceaufärbung gefundenen Werte zeigen eine weitgehende Übereinstimmung. Sie dürften am verlässlichsten sein, da die Ponceaupräparate leichter auszuwerten waren und die dabei erhaltenen Kurven

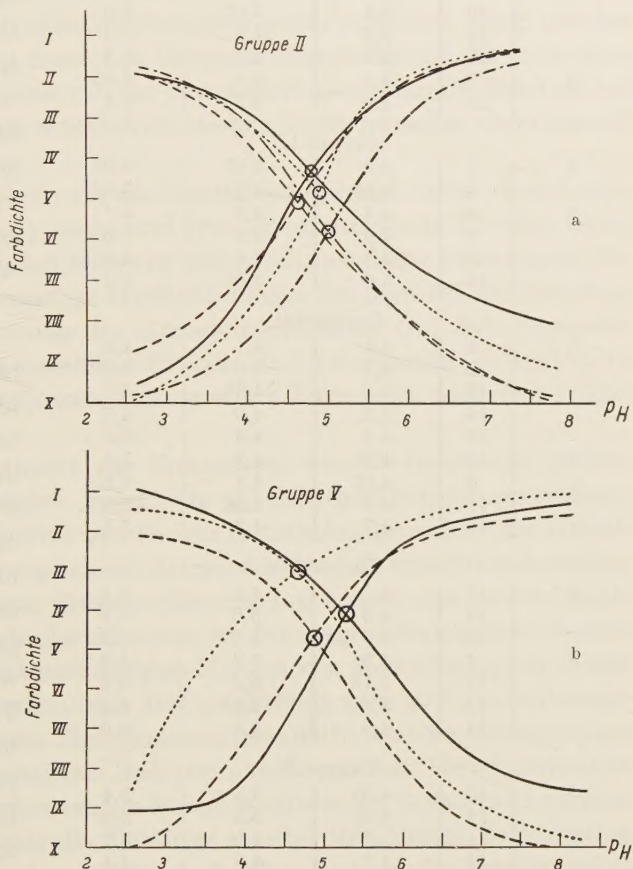


Abb. 2a u. b. a) Kurvenmäßige Ermittlung des isoelektrischen Punktes einiger Herde der Gruppe II (frühe ödematöse Quellung). b) Das gleiche bei Gruppe V (hyalin-fibrinoide Zonen)

einen regelmäßigen Verlauf bei geringerer Streuung der Meßpunkte aufwiesen. Auch die Gruppen verschiedener Zeitdauer zwischen Tod und Fixation („Zeit-

Tabelle 1

Zeit- gruppe	Fall	Kurven- schnitt	Mitte des Umladungsbereichs	
			Methylenblau	Kristall- ponceau
Gruppe I				
A	3	4,8	4,25	5,1
	13	4,8	4,5	5,15
B	9	4,6	4,15	5,0
	10	4,4	4,05	4,6
	15	4,5	4,2	5,1
C	16	4,5	4,3	5,1
	2	4,5	4,3	4,85
	20	4,8	4,2	5,1
Gruppe II				
A	1	4,8	4,65	4,95
	5	4,85	4,55	5,05
B	9	4,3	4,3	4,7
	9	4,6	4,4	5,0
	10	4,4	4,0	4,8
	15	5,0	4,95	5,1
Gruppe III				
A	6	4,4	4,1	4,8
	13	4,7	4,0	5,5
	14	5,1	4,65	5,2
	19	4,5	4,0	4,5
	19	4,5	4,3	5,0
B	16	4,5	4,3	5,1
C	4	4,65	4,4	5,0
	11	4,9	4,25	5,0
	11	4,7	4,3	5,1
Gruppe IV				
A	13	4,7	4,6	5,1
	14	4,9	5,0	5,1
	14	4,9	4,8	5,3
C	4	4,9	4,8	4,9
	11	5,15	5,2	5,1
	11	4,8	4,35	5,2
	11	4,9	4,8	5,0
Gruppe V				
A	13	4,65	3,8	5,4
	14	4,85	4,3	5,3
C	11	5,25	4,9	5,5
	11	4,7	4,8	4,4

Die tabellarische Ordnung berücksichtigt einmal die Zeitabstände zwischen Tod und Gewebefixation (A 19—25 Std, B 32—33 Std, C 45—69 Std), zum anderen bringt sie eine histologische Gruppierung (Gruppe I normale Intima, II frühe ödematöse Quellung, III hyaline Faserverdichtung, IV atheromatöse Quellungenekrosen, V hyalin-fibrinoide Zonen).

Die tabellarische Ordnung berücksichtigt einmal die Zeitabstände zwischen Tod und Gewebefixation (A 19—25 Std, B 32—33 Std, C 45—69 Std), zum anderen bringt sie eine histologische Gruppierung (Gruppe I normale Intima, II frühe ödematöse Quellung, III hyaline Faserverdichtung, IV atheromatöse Quellungenekrosen, V hyalin-fibrinoide Zonen).

gruppen“) zeigen untereinander keine signifikanten Unterschiede. Wie schon erwähnt, ist dies bei einem bradytrophem Gewebe im Gegensatz zu dem von LAVES in dieser Hinsicht bearbeiteten Leberparenchym innerhalb der bei unseren Untersuchungen vorliegenden Zeitspannen kaum anders zu erwarten. Auffällig ist allenfalls, daß das aus gleichen Aorten gewonnene Material ungeachtet verschiedenartiger Veränderungen relativ gleichartige Werte ergab.

Beurteilung

Wie die mitgeteilten Ergebnisse zeigen, ist das elektrophistologische Verhalten der Aortenintima bei verschiedengradigen Veränderungen im Sinne der Arteriosklerose nicht bemerkenswert verändert oder nur so wenig, daß dieses mit der verwendeten Methode nicht genügend zu sichern ist. Die Anwendung eines empfindlicheren Verfahrens, etwa der Pufferfärbung nach DEMPSEY u. Mitarb. (s. bei LIPP) ist dennoch bei Untersuchungen der vorliegenden Art nicht erforderlich und auch nicht angebracht, da die Genauigkeit solcher subtilen Methoden bei der notwendigen Verwendung von Leichengewebe durch unvermeidbare Fehlerquellen mit Sicherheit wesentlich eingeschränkt würde. Auch lehrt das oben erwähnte relativ gleiche Verhalten histologisch verschiedener, aber aus einer einzigen Aorta entnommener

Gewebsstückchen bzw. das relativ verschiedene Verhalten histologisch gleichartiger, aber aus verschiedenen Aorten entnommener Präparate, daß Fehlerquellen nur zum kleinen Teil bei der von uns angewandten Färbemethode liegen können.

Die Feststellung, daß das elektrohistologische Verhalten verschieden stark arteriosklerotisch veränderter Intimastrukturen nicht entscheidend von normalen Intimazonen abweicht, darf natürlich nicht ohne weiteres zu dem Schluß führen, das Eiweißmosaik dieser Strukturen sei nicht verändert. Eine Ursache der fehlenden Divergenz der Meßwerte bei morphologisch unterschiedlichen Strukturen kann darin liegen, daß, wie zu Anfang dargelegt, auch beliebig verschiedene Eiweißkörper sich elektrohistologisch gleich verhalten, wenn nur das Verhältnis ihrer sauren und basischen Gruppen übereinstimmt. Es wäre aber nicht angängig, wollte man das von der Norm nicht abweichende Ergebnis bei der Vielfalt der untersuchten arteriosklerotischen Veränderungen allein hierauf zurückführen.

Bei unseren Untersuchungen war die Vorstellung führend, in der veränderten Gefäßintima grundsubstanztypische und grundsubstanzfremde Proteine abzugrenzen, sei es, daß es sich bei letzteren um frisch insudierte plasmogene Eiweiße oder um präcipitationsartige Hyalinbildungen handelt. Bei der histologischen Technik der Bestimmung des Umladebereiches ist *eine* Störungsquelle nicht zu vermeiden: Frisch insudierte Eiweiße sind naturgemäß insoweit nicht zu fassen, als sie mit den wäßrigen Lösungen der Fixierungs- und Färbemittel eluiert werden können.

Grundsätzlich steht natürlich zur Erörterung, wieweit überhaupt größere Serumeiweißmengen sozusagen kurzfristig in die Gefäßintima permeieren. SCHALLOCK hat auf die Labilität und leichte Entmischungstendenz der Grundsubstanzen hingewiesen. Bezüglich der Arteriosklerose hält er es für wahrscheinlich, daß es keiner massiven Stoffeinschwemmung bedarf, um schleichende, sich über Jahre hinziehende Änderungen der Intimagrundsubstanzen herbeizuführen, sondern daß selbst geringfügige Mengen von Molekülgruppen in sehr langsam ablaufenden Prozessen über Haftpunktbildungen zu Grundsubstanzenverfestigungen führen können. Sind demnach insudierte Eiweißmolekülgruppen nur in einer das durchschnittliche Maß der physiologischen Gefäßpermeation nicht oder nur wenig überschreitenden Menge jeweils in der Gefäßwand vorhanden und wirken sie mehr über die Zeitlänge als über ihre Menge, dann können sie sich durchaus unserer Nachweismethode der Verschiebung des isoelektrischen Punktes entziehen. Ihr zunächst unmerklich sich vollziehender Einbau in die Grundsubstanz muß das isoelektrische Gleichgewicht nicht stören. Die Anlagerung von Serumeiweißmolekülen wird sich infolge des amphoteren Charakters der Eiweiße schnell dem IEPm der örtlichen Gegebenheiten anpassen können. Diese Erörterungen gelten für die in der Frühphase arteriosklerotischer Gefäßschäden angenommene ödemartige *Eiweißinsudation*. Der nicht geglückte Nachweis kann allerdings auch als Gegenargument gegen die These einer

besonderen frühen Eiweißinsudation im Beginne arteriosklerotischer Veränderungen gewertet werden. Hier sind neue Untersuchungen mit anderen Methoden erforderlich.

Die eingangs gestellte weitere Frage bezog sich auf das Verhalten des isoelektrischen Punktes *hyaliner Strukturen* in Arterioskleroseherden, denen für die Störung einer regulativen Anpassung der Erfordernisdurchblutung an mittelkalibrigen Arterien (Cerebral-, Coronar- und Nierenarterien) eine besondere Bedeutung zukommt (E. MÜLLER und M. FRIEDLEIN). Nun ist die Faserhyalinisierung kein einheitlicher Vorgang. Hyalinisierung des Bindegewebes bedeutet Entwicklung eines durch zunehmende Strukturlosigkeit gekennzeichneten Zustandes. Dieser Entwicklung können vorwiegend Kollagenisierungsvorgänge zugrunde liegen. In einem solchen hyalin-kollagenen Endprodukt sind Verschiebungen des IEPm weniger zu erwarten — hyalinisiertes und nicht-hyalinisiertes kollagenes Fasergewebe zeigen auch färberisch bei üblichen histologischen Farbstoffen wie Eosin u. a. eine gleichartige Acidophilie. Hyalinbildung des Bindegewebes kann im allgemeinen aber auch durch adsorptive Bindung von Eiweiß auftreten (E. MÜLLER), wobei in früheren Untersuchungen die Herkunft solcher Proteine aus dem Blutplasma wahrscheinlich gemacht werden konnte. Dieser Vorgang schien auch bei der Faserhyalinisierung in arteriosklerotischen Herden nahezuliegen.

Über die Art und Geschwindigkeit der einzelnen Vorgänge bei der formalen Genese des Hyalinisierungsprozesses ist nur wenig bekannt. Selbst in der Kollagenisierungsform des hyalinen Bindegewebes kann sowohl ein primär und kontinuierlich fortlaufender Vorgang einer Hyperkollagenisierung vorliegen — elektrohistologisch würde er gekennzeichnet sein durch einen gleichbleibenden IEPm — als auch eine „Umprägung“ adsorbierter Fremdeiweiße zu hyalin-kollagener Substanz erfolgt sein. Die Bildung von solchem Adsorptionshyalin läßt sich an geeignetem Material durch Extraktion ammoniumsulfatfällbarer Eiweiße nachweisen. Dieser Nachweis ist aber an den meist gemischt aufgebauten Arterioskleroseherden (vgl. Abb. 1) nicht möglich, da ausreichende hyaline Massen zur Aufschließung nicht zu gewinnen sind. Das elektrohistologische Äquivalentbild einer reinen adsorptiven Eiweißbindung an Bindegewebsfasern ist bisher nicht untersucht. Der IEP der Albumine des menschlichen Blutplasmas liegt nach RAUEN bei p_H 4,9, bei den Globulinen fand er sich für Mucoproteine bei 2,7, für Lipoproteine bei 5,2—5,5, für γ -Globuline sind Werte bis 8,2 (Mittelwert 6,9) angegeben. Bei einer adsorptiven Bindung hochmolekularer Plasmaeiweiße an Intimastrukturen (Lipoproteine u. a.) wäre eine Verschiebung des IEP gegen den fast konstant gefundenen Wert normaler Intimastrukturen (bei p_H 4,5—4,8) zu erwarten gewesen. Eine solche fand sich nur einmal bei einer unmittelbar lichtungsnahen sehr homogen-hyalinen Zone eines offenbar in Organisation befindlichen flachen hyalinen Thrombus, in deren Bereich der Umladungsbereich für das exaktere Kristallponceau bei p_H 5,8 lag. Im all-

gemeinen ließ sich aber in hyalinen Zonen arteriosklerotischer Herdbildungen der Aorta, von geringen Streuungen abgesehen, kein Bild besonderen Abweichens des IEPm ablesen, womit die vermutete „Imprägnation“ von Intimafasern mit Plasmaeiweißen fraglich wird.

Von LETTERER u. Mitarb. wurde in verschiedenen Untersuchungen der Aminosäurenbestand verschiedener Eiweiße, darunter von Amyloid, Hyalin und Kollagen analysiert. Die Aminosäuren-Zusammensetzung ergab in den Amyloidbestimmungen — allerdings bei schwankenden Befunden — in den für die elektrische Ladung wichtigen Aminosäuregruppen ein Überwiegen solcher mit saurem Charakter, wofür sich eine Bestätigung auch in der Prüfung des isoelektrischen Punktes des Amyloids fand, welcher zwischen p_H 3,8 und 4,6 ermittelt wurde. Beim Hyalin — es handelte sich um Oberflächenhyalin vom Zuckergußtyp, das nach eigenen Untersuchungen vorwiegend aus *kollagenen* Substanzen gebildet ist — fanden LETTERER u. Mitarb. unter starkem Vortreten des Glycins eine Verminderung der Aminosäuren mit saurem Charakter. Dem entspricht in unseren Untersuchungen der im Gegensatz zum Amyloid mehr im höheren p_H -Bereich (p_H 5,0—5,1 bei Ponceaufärbung) anzutreffende Schnittpunkt der Färbungskurven hyaliner Zonen, wobei u. U. grundsätzliche methodisch bedingte leichte Verschiebungen des IEP zu niedrigeren p_H -Werten noch abzurechnen wären (s. Abschnitt Beurteilung der Methode). Damit wird aber — die Einschränkung von additiv sich dem normalen IEP der Intimafasern angleichenden sauren und basischen Gruppen von Eiweißgemischen ausgenommen — einerseits eine stärkere reine Adsorption plasmogener Proteine an Fasersubstanzen im hyalinen Arterioskleroseherd unwahrscheinlicher; andererseits entspricht das Verhalten des IEPm mehr dem Bilde, wie es kollagene Substanzen erwarten lassen.

Bedeutet das nun, daß die Hyalinisierung in arteriosklerotisch veränderten Gefäßwandschnitten in der Regel vorwiegend eine Grundsubstanzänderung im Sinne einer schleichenden primären Verfestigung der Grundsubstanz (SCHALLOCK) mit *Kollagenisierungstendenz* ist, bei welcher von uns und anderen, auch von HUEPER angenommene großmolekuläre insudierte Eiweiße in manchen Fällen wohl die einleitende, aber im ganzen nicht die vermutete entscheidende Rolle spielen? Dann würde sich das Gewicht der arteriosklerotischen Hyalinose von der viel diskutierten Einschwemmung von Eiweiß-Lipidgemischen mehr nach der Seite der vielseitig, hypoxisch (ROTTER u. a.), aber auch hormonell und konstitutionell beeinflussbaren primären Änderung des Zustandes der Grundsubstanzen (SCHALLOCK) verlagern. Eine solche Akzentverschiebung in den Vorstellungen sowohl über Frühveränderungen als im besonderen über die hyaline Intimasklerose bei der Arteriosklerose findet in unseren Untersuchungen eine Begründung, wenn es auch vermutlich noch vieler weiterer Untersuchungen bedarf, um diese Vorgänge morphogenetischer Art eindeutig aufzuklären.

Zusammenfassung

Es wurde an menschlichen Aorten mit der Pufferfärbung nach PISCHINGER die elektrostatische Gesamtladung normaler Intimastrukturen und arteriosklerotisch veränderter Zonen — insbesondere von Bereichen ödematöser Frühinsudation und hyaliner Faserverdichtung — untersucht. Das elektrohistologische Verhalten ergab hierbei keine entscheidenden Abweichungen untereinander. Die Analyse und Erörterung dieser Ergebnisse führt zu der Ansicht, daß weniger die viel erörterte adsorptive Anlagerung von Plasmaeiweißen an Intimafasern als vielmehr eine langsam sich entwickelnde Verfestigung der Grundsubstanz mit Kollagenisierungstendenz bei der auch funktionell bedeutsamen Hyalinose arteriosklerotisch veränderter Intimabereiche die entscheidende Rolle spielt.

Literatur

- BREDT, H.: Über die Sonderstellung der tödlichen jugendlichen Coronarsklerose und die gewebliche Grundlage der akuten Coronarinsuffizienz. *Beitr. path. Anat.* **110**, 295 (1949).
- BREDT, H.: Die Morphologie der Arteriosklerose. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **41**, 11 (1957).
- FRICKE, R., u. I. LEONHARDT: Isoelektrischer Punkt und Pufferlösung. *Naturwissenschaft* **37**, 428 (1950); zit. n. SCHÜMMELFEDER.
- HAUG, H.: *Leitfaden der mikroskopischen Technik*. Stuttgart: Thieme-Verlag 1959.
- HOLLE, G.: Über die Lipoidose, Atheromatose und Sklerose der Aorta und deren Beziehungen zur Endoarteritis. *Virchows Arch. path. Anat.* **310**, 160 (1943).
- HUEPER, W.: *Arch. Path. (Chicago)* **41**, 139 (1946); zit. n. SCHALLOCK.
- LAVES, W.: Histologische Untersuchungen mit gepufferten Farblösungen zum postmortalen Abbau der Kernchromatine und des Plasmas der Leberzellen. *Virchows Arch. path. Anat.* **279**, 618 (1931).
- LAVES, W.: Über regressive Zellveränderungen. Vergleichend morphologische, physikalisch-chemische Untersuchungen an Leberepithelien. *Frankfurt. Z. Path.* **43**, 283 (1932).
- LETTERER, E., W. GEROK u. G. SCHNEIDER: Vergleichende Untersuchungen über den Aminosäurebestand von Serum-Eiweiß, Lebereiweiß, Amyloid, Hyalin und Kollagen. *Virchows Arch. path. Anat.* **327**, 327 (1955).
- LETTERER, E.: *Allgemeine Pathologie*. Stuttgart: Thieme-Verlag 1959.
- LEVINE, N. D.: *Stain-Technol.* **15**, 91 (1940); zit. n. LIPP.
- LIPP, W.: *Histochemische Methoden*. Ad 1 A 1 (Lieferung 7). München: Oldenbourg-Verlag 1955.
- MAYERSBACH, H. v., u. G. SCHUBERT: Immunhistologische Methoden III: Die unspezifischen Reaktionen zwischen markierten Seren und Geweben bei der immunhistologischen Technik. *Acta histochem. (Jena)* **10**, 44 (1960).
- MEESSEN, H.: Experimentelle Untersuchungen zum Collapsproblem. *Beitr. path. Anat.* **102**, 191 (1939).
- MEYER, W. W.: Zum Gewebsbild der Thrombangitis obliterans, insbesondere über die entzündliche Entstehung und weitere Umwandlung der Fibrinablagerungen in der Intima. (Zur morphologischen Differentialdiagnose zwischen Thrombangitis obliterans und Arteriosklerose.) *Virchows Arch. path. Anat.* **314**, 681 (1947).
- MEYER, W. W.: Die Bedeutung der Eiweißablagerungen in der Histogenese arteriosklerotischer Veränderungen der Aorta. *Virchows Arch. path. Anat.* **316**, 268 (1949).
- MICHAELIS, L.: *Zit. n. B. ROMEIS, Taschenb. mikrosk. Techn.* München-Berlin: Oldenbourg-Verlag 1943.
- MÜLLER, E.: Untersuchungen über Wesen und Entstehungsbedingungen des bindegewebigen Hyalins. *Beitr. path. Anat.* **97**, 41 (1936).
- MÜLLER, E.: Die tödliche Coronarsklerose bei jüngeren Männern. *Beitr. path. Anat.* **110**, 103 (1949).
- MÜLLER, E., u. M. FRIEDLEIN: Meßergebnisse bei coronarsklerotischem Mediaschwund und Intimaumbau und ihre Bedeutung für die vasomotorische Durchblutungsregelung. *Frankfurt. Z. Path.* **69**, 268 (1958).

- PISCHINGER, A.: Die Lage des isoelektrischen Punktes histologischer Elemente als Ursache ihrer verschiedenen Färbbarkeit. *Z. Zellforsch.* **3**, 169 (1926).
- PISCHINGER, A.: Diffusibilität und Dispersität von Farbstoffen und ihre Beziehung zur Färbung bei verschiedenen H-Ionen-Konzentrationen. *Z. Zellforsch.* **5**, 347 (1927).
- RAUEN, H. M.: Biochemisches Taschenbuch. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag 1956.
- RIBBERT, H.: Über die Genese der arteriosklerotischen Veränderungen der Intima. *Verh. dtsh. Path. Ges.* **8**, 168 (1904).
- ROTTER, W.: Über die Bedeutung der Ernährungsstörung, insbesondere des Sauerstoffmangels für die Pathogenese der Gefäßwandveränderungen mit besonderer Berücksichtigung der „Endarteriitis obliterans“ und der „Arteriosklerose“. Zugleich ein Beitrag zum Entzündungsproblem. *Beitr. path. Anat.* **110**, 46 (1949).
- ROTTER, W.: Allgemeine und spezielle Pathologie der Arteriosklerose. *Nauheimer Fortbildg. Lehg.* **23**, 8 (1958).
- SCHALLOCK, G.: Neuere Untersuchungen zur pathologischen Anatomie der Gefäßwand. *Nauheimer Fortbildg. Lehg.* **23**, 20 (1958).
- SCHÜMMELFEDER, N., u. K. F. STOCK: Die Bestimmung des Umladebereiches (isoelektrischer Punkt) von Gewebeelementen mit dem Fluorochrom Acridinorange. *Z. Zellforsch.* **44**, 327 (1956).
- SCHÜMMELFEDER, N.: Einfluß der Pufferlösung auf die färberische Bestimmung des Umladebereiches von Gewebeelementen. *Z. Zellforsch.* **44**, 488 (1956).
- SINAPIUS, D.: Zur Genese atherosklerotischer Frühveränderungen an der Aorta. *Virchows Arch. path. Anat.* **318**, 316 (1950).
- YASUZUMI, G.: Über die Verschiebung des isoelektrischen Punktes der fixierten Blutzellen. *Folia anat. jap.* **11**, 267 (1933).
- YASUZUMI, G.: Über den isoelektrischen Punkt der tierischen Gewebe. I. Mitteilung: Bestimmungsmethoden des isoelektrischen Punktes von Protoplasten und Verschiebung dieses Punktes der Erythrocyten von Kaninchen durch Formaldehyd. *Folia anat. jap.* **11**, 415 (1933).
- ZEIGER, K.: Der Einfluß von Fixationsmitteln auf die Färbbarkeit histologischer Elemente. *Z. Zellforsch.* **10**, 481 (1930).
- ZEIGER, K.: Das Ladungsmosaik der Epidermis. *Z. Zellforsch.* **23**, 431 (1936).
- ZEIGER, K.: Zur Methodik der Bestimmung des Umladebereiches histologischer Elemente im fixierten Zustand. *Z. wiss. Mikrosk.* **54**, 82 (1937).

Prof. Dr. ERICH MÜLLER

Pathologisches Institut der Universität Erlangen

Druck: Brühlsche Universitätsdruckerei Gießen

Lebenslauf:

Am 23. März 1937 wurde ich, Volker Clemens Helmut v. Loewenich in Erlangen als Sohn des damaligen Privatdozenten und Studienrates Dr. theol. Walther v. Loewenich und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Thielicke geboren. Vom 1. September 1943 bis zum 15. Juli 1946 besuchte ich in Erlangen die Volksschule. Am 3. September 1946 trat ich in das humanistische Gymnasium in Erlangen ein, an dem ich am 13. Juli 1954 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1954/55 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Erlangen, an der ich am 30. April 1957 die ärztliche Vorprüfung bestand. Während des klinischen Studiums verbrachte ich ein Semester an der Universität Wien. Die ärztliche Prüfung legte ich am 11. Juli 1960 in Erlangen ab. Zur Zeit arbeite ich als Medizinalassistent im pathologischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg.

